

DETERMINACIÓN DE LOS MOTIVOS aminoacídicos presentes en los sitios de unión a los antígenos de los alelos del gen BoLA-DRB3 en una población Holstein de La Pampa y su asociación con mastitis

Baltian, L.R.¹; Ripoli, M.V.²; Giovambattista, G.²

Resumen: La intensidad de la respuesta inmune es regulada por los motivos aminoacídicos en los sitios de reconocimiento a antígenos (SRA) presentes en los bolsillos de las moléculas presentadoras del Complejo Principal de Histocompatibilidad. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la asociación entre dichos motivos y la resistencia/susceptibilidad a mastitis medida a través del conteo de células somáticas (CCS) en leche de ganado Holstein de la provincia de La Pampa. La población se dividió en: 1) grupo caso con alto CCS y presencia de mastitis (≥ 250.000 cel/ml, susceptible) y 2) grupo control con bajo CCS (< 250.000 cel/ml, resistente). De una muestra de 128 animales, se tipificaron 40 para el segundo exón del gen BoLA-DRB3 mediante la técnica de secuenciación directa; 20 vacas correspondientes a cada grupo. Se detectaron 24 alelos en la población analizada. Se calcularon las frecuencias génicas de los motivos aminoacídicos de los cinco bolsillos (1, 4, 6, 7 y 9) del SRA en los dos grupos de animales. Se utilizó el test Odds Ratio (OR) de Woolf-Haldane para estudiar la asociación. No se hallaron diferencias significativas entre los motivos aminoacídicos de los bolsillos 1, 4, 7 y 9 entre los grupos con alto y bajo CCS. Sin embargo, el motivo T11Y30 del bolsillo 6 (presente en los alelos BoLA-DRB3*0601, *0901 y *4401) evidenció un valor significativo de $OR = 0,11$ ($p = 0,03$). Esto sugiere una asociación entre dicho motivo con un menor riesgo a desarrollar mastitis. El rol del motivo aminoacídico T11Y30 en la respuesta inmune de los animales que lo poseen deberá ser validado en poblaciones independientes.

Palabras claves: motivos aminoacídicos, mastitis, respuesta inmune, BoLA-DRB3, Holstein.

Determination of amino acid motifs present in the antigen-binding site of BoLA-DRB3 alleles in a Holstein population of La Pampa y su asociación con mastitis.

Abstract: The intensity of the immune response is regulated by amino acid motifs in antigen recognition sites (ARS) present in the pockets of Major Histocompatibility Complex molecules. The objective of this work was to study the association between these motifs and resistance/susceptibility to mastitis measured by somatic cell counts (SCC) in milk from Holstein cattle from the province of La Pampa. The population was divided into: 1) case group with high SCC and presence of mastitis ($\geq 250,000$ cells/ml susceptibility) and 2) control group under SCC ($< 250,000$ cells/ml resistant). From a sample of 128 animals, 40 were genotyped for the second exon of BoLA-DRB3 gene by direct sequencing technique, 20 cows for each group. A total of 24 alleles were detected in the analyzed population. Gene frequencies of amino acid motifs of the five pockets (1, 4, 6, 7 and 9) from ARS in the two groups of animals were calculated. Test Odds Ratio (OR) Woolf-Haldane was used to study the association. No significant differences between amino acid motifs of pockets 1, 4, 7 and 9 between groups with high and low SCC were found. However, the T 11 Y 30 motif in pocket 6 (found in BoLA-DRB3 * 0601, * 0901 and * 4401 alleles) showed a significant OR value = 0.11 ($p = 0.03$). This suggests an association between this motif with a lower risk of developing mastitis. The role of amino acid motif T 11 Y 30 in animal immune response should be validated in independent populations.

Key Words: amino acid motifs, mastitis, immune response, BoLA-DRB3, Holstein.

1 FCV, UNLPam.

2 IGEVET-CONICET; FCV; UNLP; lbaltian@yahoo.com.ar.

El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) desempeña un rol central en el control de la respuesta inmune y la susceptibilidad a una gran variedad de enfermedades, principalmente autoinmunes e infecciosas. En bovinos recibe el nombre de Antígeno Linfocitario Bovino (BoLA) (Amorena y Stone, 1978; Spooner *et al.*, 1978). Ha sido mapeado en el autosoma 23 bovino (BTA23) (Fries *et al.*, 1993), dentro de una extensión de 4.000 Kb, que contiene más de 154 genes estrechamente ligados. Comprende tres clases de moléculas: clase I, clase II y de clase III. Del total de genes, 60 están dentro de la región clase I, 38 dentro de la región clase II y 56 dentro de la región clase III (The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium *et al.*, 2009).

La principal función del BoLA es la de proveer un contexto para el reconocimiento de los antígenos fragmentados (Sommer, 2005). La secuenciación completa del genoma bovino permitió la comparación del HLA con el BoLA y se observó que están organizados de una manera similar, pero existen algunas diferencias, como por ejemplo, la presencia de un rearrreglo principal dentro de la región de clase II. Esto ha conducido a la división de las moléculas clase II del BoLA en dos subregiones distintas: IIa y IIb, separadas por alrededor de un tercio de la longitud del cromosoma (Takeshima y Aida, 2006).

Las moléculas de Clase I del BoLA están constituidas por una cadena α (alfa) que atraviesa la membrana celular y tiene un peso molecular aproximado de 45.000 daltons, y por una cadena más corta llamada microglobulina $\beta 2$ (Beta 2), que tiene un peso aproximado de 12.000 daltons. La cadena α no está asociada covalentemente con la β microglobulina. Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de las moléculas de Clase I forman una hendidura que aloja los péptidos antigénicos, los cuales son presentados a las células T CD8.

Las moléculas de clase II están formadas por la asociación no covalente de cadenas α y β , codificadas por distintos genes del MHC, cuyos dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ forman los sitios de unión de antígenos. Dichas moléculas de clase II se encuentran en la superficie de las células procesadoras de antígenos, tales como las células dendríticas, macrófagos y linfocitos B y presentan péptidos derivados de antígenos extracelulares a las células T CD4+.

El sitio de reconocimiento de antígenos (SRA) consiste en un surco con un piso formado por una hoja plegada β y dos paredes, cada una formada por una hélice α . La selectividad de los alelos del MHC para unir péptidos es mediada por las propiedades bioquímicas de esos bolsillos, que son 5

(denominados P1, P4, P6, P7, P9) y juegan un rol crítico en la unión del péptido. La afinidad de la unión del péptido a esos bolsillos estaría determinando la cantidad y calidad de la respuesta inmune.

Las dos subregiones de las moléculas de Clase II están separadas por una distancia relativamente grande, que se expande al menos 15 centimorgan (cM) entre la región IIa de la secuencia DRB3 y la región clase IIb. La distancia entre las dos regiones de Clase II, diferencia al MHC bovino del MHC de humano y ratón. Los genes y los productos de clase IIa son los más estudiados porque presentan altos niveles de polimorfismo. Esta región comprende los grupos de genes DR y DQ.

Los mapeos físicos y genéticos muestran que estos genes están próximos entre sí (Andersson *et al.*, 1986; Scott *et al.*, 1987). Se han identificado un total de catorce genes: DRA, DRB (DRB1, DRB2, DRB3), DQA (DQA1, DQA2, DQA3, DQA4, DQA5) y DQB (DQB1, DQB2, DQB3, DQB4, DQB5) (Takeshima y Aida, 2006).

La subregión DR es la más conservada a través de las especies. En bovinos sólo un alelo del BoLA-DRA ha sido identificado en base a datos de secuencias. Con respecto al BoLA-DRB hay 3 loci, pero sólo el DRB3 es funcional. El BoLA-DRB1 es un pseudogen y el gen BoLA-DRB2 es pobremente expresado (Russell *et al.*, 1994), pero exhibe algo de polimorfismo.

Dentro del BoLA, el exón 2 del gen BoLA-DRB3 es reconocido por su rol funcional predominante en la resistencia/susceptibilidad a enfermedades (Diaz *et al.*, 2005; Yoshida *et al.*, 2009). Este gen es altamente polimórfico ya que se han reportado hasta el momento 130 alelos en la base de datos Immuno Polymorphism Database (IPD)-MHC (http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/ipd/mhc/view_nomenclature.cgi?bola.drb3) y codifica elementos funcionales de restricción, que es el proceso mediante el cual un linfocito puede reconocer un antígeno como propio o extraño (Davies *et al.*, 1997).

El BoLA se ha vinculado con la variación en resistencia/susceptibilidad a enfermedades infecciosas, tales como el linfoma inducido por el virus de la leucosis bovina (bovine leukemia virus, BLV) (Xu *et al.*, 1993; Zanotti *et al.*, 1996; Dietz *et al.*, 1997b; Mirsky *et al.*, 1998; Aida *et al.*, 2000; Aida, 2001; Aida, 2004; do Nascimento *et al.*, 2006; Juliarena *et al.*, 2008; Panei *et al.*, 2009) y mastitis inducida por bacterias (Østergaard 1989; Lundén *et al.*, 1990; Mallard *et al.*, 1995; Dietz *et al.*, 1997; Kelm *et al.*, 1997; Starkenburg *et al.*, 1997; Sharif *et al.*, 1998, 2000; Park *et al.*, 2004; Takeshima y Aida 2006; Castro *et al.*, 2006; Rupp *et al.*, 2007; Baxter *et al.*, 2009; Zambrano *et al.*, 2011; Baltian *et al.*, 2012; Chu *et al.*, 2012; Yoshida *et al.*, 2012). Además, parece tener influencia sobre otros rasgos tales como

producción de leche, crecimiento y reproducción (Machado *et al.*, 2005; Takeshima y Aida, 2006; Do Nascimento *et al.*, 2006), los cuales no son frecuentemente medidos en humanos, y variaciones en la respuesta inmune individual a antígenos.

Como es bien conocido, la variabilidad genética dentro del MHC se ve determinada por un alto número de alelos, presencia de varias copias de cada gen, número variable de genes en los distintos haplotipos y variaciones alélicas en las regiones de control de la expresión.

Por otra parte, la resistencia genética es un rasgo multigénico, es decir, determinado por muchos genes, entre los cuales se encuentran los del MHC. El polimorfismo de estos genes determina la diversidad de las proteínas codificadas de la respuesta inmune, y tendría como consecuencia la variación genotípica en la resistencia/susceptibilidad. De ahí que los loci del MHC se constituyen en los principales genes candidatos para el estudio de asociación entre marcadores genéticos y resistencia/susceptibilidad a enfermedades infecciosas.

La mastitis es una importante enfermedad del ganado lechero que trae como consecuencia baja en las producciones y costos elevados por atención veterinaria. Consiste en una reacción inflamatoria de la glándula mamaria. Dicha enfermedad daña el tejido secretor de leche y lo substituye con el tiempo por tejido cicatrizal, lo cual reduce la superficie de la glándula productora de leche.

Varios trabajos analizaron las asociaciones entre la estructura proteica de las moléculas del MHC y el reconocimiento y la presentación de antígenos, por lo tanto con la respuesta inmune y la resistencia a las enfermedades infecciosas. Estos trabajos mostraron que la intensidad de la respuesta inmune es regulada por los motivos aminoacídicos de los sitios de unión a antígenos presentes en los bolsillos de las moléculas presentadoras del MHC (Matsushita *et al.*, 1994; Konnai *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2009).

Los mecanismos moleculares por los cuales los polimorfismos de las secuencias de clase II del MHC confieren susceptibilidad a enfermedades no son muy claros en gran parte de los casos. En base a la integración del análisis de tipo genético, epidemiológico y estructural es posible comprender en forma más profunda la contribución relativa de cada polimorfismo individual del MHC, de la potencial interrelación entre ellos y del significado de los efectos aditivos de cada variación alélica.

Desde hace un tiempo una de las hipótesis que explicarían los mecanismos moleculares que subyacen en las asociaciones MHC-enfermedad está en el estudio de los motivos aminoacídicos.

Sharif et al. (2000) investigaron la relación entre los motivos aminoacídicos presentes en el sitio de unión de los antígenos de los alelos BoLA-DRB3 y la ocurrencia de mastitis causadas por algunos patógenos. Yoshida *et al.* (2009) también estudiaron la asociación entre los motivos aminoacídicos de los alelos del BoLA-DRB3 con resistencia/ susceptibilidad a patógenos de mastitis.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue analizar la relación entre los motivos aminoacídicos de alelos del gen BoLA-DRB3 y la resistencia/ susceptibilidad a mastitis medida a través de CCS.

**\ Materiales y Métodos **

Población en estudio y datos a evaluar

El estudio experimental se llevó a cabo en animales de la raza Holstein de la Provincia de La Pampa. El rodeo analizado en el presente estudio pertenecía a un establecimiento lechero que no poseía registros genealógicos pero sí registros de la procedencia de los animales. Esto último permitió verificar que el rodeo fue armado con animales de distintos tambos, por lo tanto, los animales estudiados no compartían madre o padre.

Se extrajeron 5 ml de sangre entera a 128 animales y la misma fue conservada con EDTA a -20°C hasta su utilización. Estos individuos fueron seleccionados de un rodeo que presentaban registros de al menos dos lactancias y se los analizaron durante 4 lactaciones más.

Mensualmente se registraron los conteos de células somáticas y registros de producción tales como litros de leche, porcentaje de grasa en leche y porcentaje de proteínas a lo largo de toda lactancia durante cuatro años. Del total de vacas muestreados, se seleccionaron para el análisis aquellas que contaban con un promedio de 35 controles lecheros a largo de los 4 años de estudio.

Diseño experimental

El presente estudio se basó en la identificación de motivos aminoacídicos asociados a susceptibilidad/resistencia del exón 2 del gen BoLA-DRB3. La identificación se realizó a través de la búsqueda de cambios en el ADN que se encontraron presentes con mayor frecuencia en el grupo caso, representado por individuos con conteos de células somáticas mayor o igual a 250.000 por mililitro leche ($CCS \geq 250.000$ cel/ml). Este grupo incluyó animales

que sufrieron mastitis al menos dos veces. El grupo caso se comparó con individuos con registro de células somáticas menor a 250.000 por mililitro de leche (CCS < 250.000 cel/ml, grupo control).

Extracción de ADN

El ADN genómico se extrajo a partir de las muestras de sangre entera mediante la técnica de DNA zolâ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), según las indicaciones del proveedor. El ADN genómico extraído se analizó en geles de agarosa. Estos se sumergieron en bromuro de etidio durante ~10 minutos y se observaron en transiluminador de emisión de luz ultravioleta (UV). Los productos de amplificación se verificaron en geles de poliacrilamida.

Tipificación del exón 2 del gen BoLA-DRB3 por PCR-SBT

El exón 2 del gen BoLA-DRB3 se tipificó mediante la técnica de Secuenciación Directa (PCR-SBT) propuesta por Takeshima et al. (2009).

La mezcla de la reacción llevó 4 ml de ADN, 34,75 ml de agua, 5 ml de buffer, 4 ml de dNTPs, 2 ml de cebadores y 0,25 ml de Taq en un volumen final fue de 50 ml. Los oligonucleótidos utilizados fueron: DRB3FRW and DRB3REV (Miltiadou *et al.*, 2003) (Figura 7).

El perfil del ciclado fue: una etapa de desnaturalización de 94 °C durante 2 minutos y 35 ciclos a 44 °C durante 30 segundos, 57 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1 minuto y por último una etapa de extensión a 72 °C durante 2 minutos.

Los amplificados se chequearon en geles de acrilamida al 6% -1X TBE y se realizó tinción con Bromuro de Etidio. Las bandas de ADN fueron visualizadas con un transiluminador de luz UV. Posteriormente, los productos de amplificación se purificaron por el método de PEG para ser utilizados como molde en las reacciones de secuenciación.

La secuenciación de los productos de PCR se llevó a cabo mediante un secuenciador de tecnología capilar MEGABACE 1000 (GE Healthcare, USA) utilizando el kit DYEnamic ET Terminator Kit (GE Healthcare). Las secuencias crudas fueron editadas usando el programa Sequence Analyzer (GE Healthcare). Las secuencias obtenidas se analizaron con el software Assign 400 ATF (Conexio Genomics, Fremantle, Australia; Takeshima *et al.*, 2009).

Para analizar las secuencias de aminoácidos correspondientes al exón 2 del gen BoLA-DRB3 se alinearon con el programa CLUSTAL-W 1.8 multiple alignment software (Baylor College of Medicine-<http://searchlauncher.bmc.tmc.edu>).

Para estudiar la asociación entre el CCS y los motivos aminoacídicos se utilizó el test exacto de Fisher, el de Odds Ratio (OR) de Woolf-Haldane y los intervalos de confianza. Estos cálculos se realizaron mediante el paquete de R EpiTools (<http://www.r-project.org/>).

\ Resultados \

Con el fin de determinar las frecuencias génicas de los motivos aminoacídicos de los sitios de unión al antígeno (aminoácidos 9, 11, 13, 26, 28, 30, 37, 57, 61, 67, 70, 71, 85 y 86) presentes en los cinco bolsillos (1, 4, 6, 7 y 9), las secuencias aminoacídicas correspondientes a los 24 alelos del gen BoLA-DRB3 detectados fueron alineadas y comparadas con el alelo BoLA-DRB3*0101.

Al realizar el alineamiento se detectaron sustituciones de aminoácidos en todos los sitios de unión al antígeno. Las sustituciones se detectaron en las posiciones 9, 11, 13, 26, 28, 30, 37, 57, 61, 67, 70, 71, 85 y 86 correspondientes a los bolsillos 1, 4, 6, 7 y 9, los que juegan un rol crítico en la respuesta inmune (Tabla 1). Los motivos aminoacídicos fueron analizados y se calcularon las frecuencias génicas en los grupos control (resistente) y caso (susceptible).

En el bolsillo 1, el motivo aminoacídico VGFT fue el más frecuente en la población y también en el grupo de los animales susceptibles (Tabla 1). Los alelos BoLA-DRB3*14011, *2701 y *1501 compartían este motivo en este bolsillo. Mientras que el alelo BoLA-DRB3*14011 se encontró en el grupo control, los alelos BoLA-DRB3*2701 y *1501 se detectaron en ambos grupos.

El motivo aminoacídico VVFT del bolsillo 1 se encontró presente en nueve variantes. El alelo BoLA-DRB3*0101 fue detectado en el grupo control y en el grupo caso con frecuencias génicas de 10,53% y 9,52%, respectivamente. El alelo BoLA-DRB3*0201 fue detectado con frecuencia mayor en los animales susceptibles (7,14%), mientras que los alelos BoLA-DRB3*0701 y *1801 estaban tanto en el grupo control como en el caso. Los alelos BoLA-DRB3*1102, *1502 y *4401 fueron privativos del grupo resistente, en tanto, los alelos BoLA-DRB3*1601 y *20011 lo eran del grupo susceptible, siendo la frecuencia génica de ambos de 2,38%.

El motivo GGFT sólo se encontró en el alelo BoLA-DRB3*2707, que presentó una frecuencia génica de 2,63 y 2,38% en los grupos resistente y susceptible, respectivamente.

En tanto, el motivo aminoacídico GVFT fue detectado en cuatro alelos (BoLA-DRB3*1001, *1401, *2703 y *1701). La variante BoLA-DRB3*1001 estaba presente en ambos grupos con frecuencias génicas del orden del 5%. Los alelos BoLA-DRB3*1401 y *2703 sólo se detectaron en los animales resistentes, mientras que el alelo BoLA-DRB3*1701 se encontró en el grupo susceptible, con una frecuencia génica del orden del 2%.

En el bolsillo 4, formado por las posiciones 13, 26, 28, 70, 74, y 78, (Tabla 1) el motivo aminoacídico KFDEAY resultó ser el más frecuente, tanto en el grupo de animales resistentes (21,05%) como en el de animales susceptibles (16,67%), estando presente en el alelo BoLA-DRB3*1101. El motivo RFDEEV se encontró en dos alelos, la variante BoLA-DRB3*14011 presente en animales resistentes con una frecuencia génica del 7,89%, y en el alelo BoLA-DRB3*2701 en animales susceptibles con una frecuencia de 7,14%.

El motivo SFHRYY se encontró en el alelo BoLA-DRB3*1501 tanto en animales susceptibles (9,52%) como resistentes (10,53%). El motivo GLDREV se detectó en el alelo BoLA-DRB3*1102 en los animales resistentes (5,26%) y en el alelo BoLA-DRB3*2006 en ambos grupos. Los motivos SFERNY, SFEQNY y GFDQEV se encontraron en los alelos BoLA-DRB3*0101 (cuya frecuencia fue 10,53 y 9,52% en animales resistentes y susceptibles respectivamente), BoLA-DRB3*1801 y *2707. Las frecuencias génicas de ambos alelos fueron de 2,63 en animales resistentes y 2,38% en susceptibles.

En el bolsillo 6 los motivos aminoacídicos Treonina (T) y Tirosina (Y) en las posiciones 11 y 30 del (Tabla 1) fueron detectados en los alelos BoLA-DRB3*0601 (siendo su frecuencia génica 4,76%), *0901(2,38%), *0902 (11,90%) y *4401 (2,63%). La presencia de estos alelos con dichos motivos aminoacídicos en el bolsillo 6 estaría indicando resistencia a mastitis.

El motivo YC (Tyr 11 Cys30) se encontró en el alelo BoLA-DRB3*2701 en animales resistentes y susceptibles, siendo mayor la frecuencia en estos últimos (7,14%).

En el bolsillo 7, formado por las posiciones 28, 47, 61, 67 y 71, el motivo DFWFK se encontró en el alelo BoLA-DRB3*1401 (grupo de animales resistentes) y en el alelo BoLA-DRB3*2703 (animales susceptibles), pero en baja frecuencia (2,63%). El alelo BoLA-DRB3*1102 poseía el mismo motivo y solo se detectó en el grupo resistente (5,26%). El alelo *4501 también evidenció el mismo motivo en el grupo de animales susceptibles (2,38%). En tanto en el alelo BoLA-DRB3*2701 con el motivo aminoacídico DFWFR,

evidenció frecuencias génicas de 2,63% en el grupo resistente y 7,14% en animales susceptibles (Tabla 1).

En tanto, en el bolsillo 9, (Tabla 1), se encontraron los motivos aminoacídicos EYD (alelos BoLA-DRB3*0101, *0201 y *1501), EFV (BoLA-DRB3*0701), EFD (BoLA-DRB3*2701, *1801 y *1001), EID (BoLA-DRB3*1101), QYS (BoLA-DRB3*2006) y EFA (alelo BoLA-DRB3*2707) en ambos grupos de animales. El motivo EFD también se encontró en el alelo BoLA-DRB3*14011(7,89%), pero sólo en animales resistentes. Los motivos EYS presente en el alelo BoLA-DRB3*1102 (5,26%), EFS en el alelo BoLA-DRB3*1502 (2,63%), QFA en el alelo BoLA-DRB3*2703 (2,63%), EFA en el alelo BoLA-DRB3*1201 (2,38%) y ERS en el alelo BoLA-DRB3*4401 (2,63%), fueron privativos del grupo resistente.

Los motivos aminoacídicos ELS en el alelo BoLA-DRB3*1601 (2,38%), ETD en el alelo BoLA-DRB3*1701 (2,38%), EYD en el alelo BoLA-DRB3*4501 (2,38%), ERS en el alelo BoLA-DRB3*20011 (2,38%) y el motivo EFD en los alelos BoLA-DRB3*0601 (4,76%) y *0901 (2,38%) se detectaron solo en el grupo de animales susceptibles.

Asociación de los motivos aminoacídicos presentes en los alelos del gen BoLA-DRB3.2 y CCS

Mediante el test exacto de Fisher y el Odds Ratio (OR) de Woolf-Haldane se estudió la asociación entre el CCS y la frecuencia génica de los motivos aminoacídicos detectados en cada bolsillo. Estos cálculos sólo se realizaron para aquellos motivos que presentaban frecuencias apreciables en ambos grupos, caso y control (Tablas 2, 3, 4, 5 y 6).

En el bolsillo 1, los motivos aminoacídicos VGFT (Val85 Gly86 Phe89 Thr90) y VVFT (Val 85 Val 85 Phe 89 Thr 90) tuvieron valores de OR no significativos (0,84 y 1,15 respectivamente) (Tabla 2). En el caso de los motivos GGFT y GVFT no se pudieron realizar las comparaciones entre ambos grupos.

En el caso del bolsillo 4, se estimó el OR para siete motivos aminoacídicos. Los valores de OR obtenidos variaron entre 0,77 y 1,52. Ninguno de ellos resultó estadísticamente significativo (Tabla 3).

En el bolsillo 6, formado por las posiciones 11 y 30, el motivo aminoacídico TY (Thr11 Tyr30) presentó un valor significativo de OR de 0,11 ($p = 0,03$); (Tabla 4). Este valor estaría indicando resistencia a padecer mastitis, evidenciada a través de una significativa reducción en el recuento de células somáticas. En el resto de los motivos, el valor de OR varió entre 0,87 y 1,95 resultando todos ellos estadísticamente no significativos.

En el bolsillo 7 se evaluaron siete motivos. Los valores de OR obtenidos variaron entre 1,10 y 3,46. Ninguno de los motivos aminoacídicos evaluados presentó un valor de probabilidad estadísticamente significativo (Tabla 5).

En tanto en el bolsillo 9, formado por las posiciones 9, 37 y 57, se evaluaron cuatro motivos aminoacídicos. Los valores de OR obtenidos variaron entre 0,77 y 1,52. Ninguno de ellos resultó ser estadísticamente significativos (Tabla 6).

\ Discusión y Conclusiones \

Los trabajos de Matsushita *et al.* (1994); Konnai *et al.* (2003) y Yoshida *et al.* (2009) demostraron que la intensidad de la respuesta inmune es regulada por los motivos aminoacídicos de los sitios de unión a antígenos presentes en los bolsillos de las moléculas presentadoras del MHC.

Zerva *et al.* (1996) reportaron que en humanos la presencia de arginina (R) en la posición 13 ó 70 y 71 en el bolsillo 4 del HLA-DRB1 estaba relacionada con susceptibilidad a lepra tuberculoide, mientras que Vooter *et al.* (2007) encontraron que la presencia de arginina en la posición 74 en el bolsillo 4 del HLA-DRB1 estaría asociada significativamente con sarcoidosis y resistencia a enfermedades infecciosas (Torres-Galván *et al.*, 2000; Greer y Pender 2005; Jacobson *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2008).

Estudios llevados a cabo en bovinos infectados con el virus de la leucosis bovina (BLV), revelaron que la presencia de los aminoácidos ácido glutámico-arginina (ER) en la posición 70-71 de la cadena BoLA-DRβ estaría asociada con resistencia al desarrollo de linfocitosis persistente (LP). Los alelos BoLA-DRB3.2*11, DRB3.2*23 y DRB3.2*28 presentaron el motivo ER en la posición 70 y 71 de la cadena BoLA-DRβ (Lewin *et al.*, 1988; Xu *et al.*, 1993) y varios estudios reportaron la asociación del alelo BoLA-DRB3.2*11 (Sulimova *et al.*, 1995; Zanolli *et al.*, 1996; Mirsky *et al.*, 1998), DRB3.2*23 y DRB3.2*28 (Sulimova *et al.*, 1995) con resistencia a LP debido a la infección BLV, y de los alelos BoLA-DRB3.2*8 (Zanolli *et al.*, 1996; Sulimova *et al.*, 1995), DRB3.2*16, DRB3.2*22 y DRB3.2*24 con susceptibilidad a LP (Sulimova *et al.*, 1995).

Por otra parte, los alelos del BoLA-DRB3 que codifican ácido glutámico, arginina y valina (ERV) en las posiciones 74, 77 y 78, respectivamente, de la cadena BoLA-DRβ han sido asociados con resistencia al desarrollo de tumores causados por el virus BLV (Aida, 2004). Estos y otros estudios llevados a cabo en diferentes especies remarcen la importancia de estudiar los motivos aminoacídicos en los sitios de unión a los antígenos de

las proteínas presentadoras para comprender los procesos de resistencia y susceptibilidad a enfermedades infecciosas.

En bovinos, los alelos BoLA-DRB3*0601,*0901 y *4401 presentaron en las posiciones aminoácidas 11 y 30 del bolsillo 6, los aminoácidos treonina (T) y tirosina (Y) (Thr11 Tyr30). En el presente trabajo, este motivo aminoácídico evidenció un valor significativo de OR de 0,11 ($p=0,03$), lo que evidenciaría que el motivo TY del bolsillo 6 estaría asociado a un bajo CCS lo cual indicaría un bajo riesgo a desarrollar mastitis.

Por el contrario, Yoshida *et al.* (2009) encontraron que el alelo BoLA-DRB3*0901 portador del aminoácido Tyr30 se encontraba con una frecuencia significativamente alta en vacas con mastitis. Sin embargo, cuando el aminoácido tirosina en la posición 30 se combinaba con serina en posición 11 (Ser11 y Tyr30), para formar el motivo aminoácídico con SY en los alelos BoLA-DRB3*1701, *1201 y *701, los resultados obtenidos mostraron que la presencia de la enfermedad es igualmente probable tanto en el grupo caso como en el control.

Sharif *et al.* (2000) investigaron la relación entre los motivos aminoácídicos presentes en los sitios de unión de los antígenos de los alelos gen BoLA-DRB3 y la ocurrencia de mastitis causadas por patógenos. Detectaron una asociación significativa entre la presencia ácido glutámico (E) en la posición $\beta 74$ del bolsillo 4 y la ocurrencia de mastitis causada por especies de *Staphylococcus*. Este motivo estaba presente en los alelos BoLA-DRB3.2*22 (DRB3*1101), DRB3.2*23 (DRB3*2703) y DRB3.2*24 (DRB3*0101). Por el contrario, en el presente trabajo no se observaron diferencias significativas entre los motivos aminoácídicos del bolsillo 4 y el CCS.

Yoshida *et al.* (2009) reportaron que el alelo BoLA-DRB3*14011 (DRB3.2*27) que presenta el motivo aminoácídico QHGH (glutamina, histidina, glicina e histidina) en las posiciones 9, 11, 13 y 30, respectivamente, (Gln9, His11, Gly13, and His30) se encontraba asociado con resistencia a mastitis. Sin embargo, en el presente estudio este alelo se encontró asociado con altos CCS, por lo que fue considerado como un parámetro indicador de susceptibilidad a mastitis. Por otro lado, los alelos BoLA-DRB3*2707 y *2703 asociados en este estudio con bajo CCS, no presentaron ningún motivo aminoácídico correlacionado con resistencia a mastitis, tal como lo reportó Yoshida *et al.* (2009). Por otra parte, Takeshima *et al.* (2008) en ganado Holstein Japonés asociaron al alelo BoLA-DRB3*2703 con resistencia a mastitis.

Yoshida *et al.* (2009) asociaron los alelos BoLA-DRB3*0101 (correspondiente a BoLA-DRB3.2*24) y DRB3*1501 (BoLA-DRB3.2*16), que

presentaban los motivos aminoácídicos ESSY en las posiciones 9, 11, 13 y 30 (Glu9, Ser11, Ser13 y Tyr30), con susceptibilidad a mastitis (OR=1,77).

En tanto que los alelos BoLA-DRB3*1101 (BoLA-DRB3.2*22) y BoLA-DRB3*1401 (BoLA-DRB3.2*27) con los motivos aminoácídicos en Gln9, His11, Gly13, His30 y Val86, se encontraron asociados con resistencia a mastitis provocada por *Streptococcus* y *Staphylococcus coagulasa-negativo* (OR=0,43). En el caso de mastitis causada por *Escherichia coli*, las sustituciones aminoácídicas en las posiciones 9, 11, 13, y 30 tenían pequeños efectos, pero por el contrario las sustituciones en las posiciones 47 y 67 del bolsillo 7, y en las posiciones 71 y 74 del bolsillo 4 (Tyr47, Ile67, Ala71, y Ala74) fueron asociadas con resistencia.

Estos motivos estaban presentes en BoLA-DRB3*1201 (BoLA-DRB3.2*8). Sobre la base de estos resultados, se supuso que la resistencia-susceptibilidad a mastitis causada por patógenos variaba de acuerdo a las substituciones aminoácídicas en las posiciones 9, 11, 13, 30, 47, 67, 71 y 74.

De acuerdo con las investigaciones realizadas, las asociaciones entre la estructura de las moléculas del MHC con la respuesta inmune, han demostrado que la intensidad de dicha respuesta individual es regulada por los motivos aminoácídicos presentes en los bolsillos de los sitios de unión peptídica de las moléculas presentadoras del MHC.

Podemos concluir que la asociación entre el motivo T11Y30 con un menor riesgo a desarrollar mastitis, y su rol en la respuesta inmune de los animales que lo poseen, deberá ser validada en poblaciones independientes. Además serán necesarios futuros estudios funcionales in vitro e in vivo para confirmar esta asociación.

El aumento de resistencia de los microorganismos patógenos a los antibióticos y a otras drogas resalta la importancia del análisis molecular para detectar resistencia a enfermedades infecciosas.

En este sentido, los estudios de asociación entre los genes del BoLA y mastitis basados en marcadores moleculares podrían constituir una efectiva herramienta para el control de enfermedades infecciosas, ya sea mediante su aplicación en los programas de selección genética o mediante el desarrollo de vacunas más efectivas y, de esta forma, reducir los costos sanitarios que afectan a la producción lechera.

\ Bibliografía \

- Aida, Y; Takeshima, S; Nagaoka, Y; Ikegami, M; Gotoh- Inabe, K.; Kabeya, H.; Onuma, M.; Okada K. 2000. The relationship between polymorphism of the MHC class II DR gene and resistance and susceptibility to bovine leukemia virus- induced lymphoma. In: Proceeding of the International Veterinary Cytokine and Vaccine. Conference, March, 2000. 16-17; Tsukuba, Japan. p. 159-162.
- Aida, Y. 2001. Influence of host genetic differences on leukemogenesis induced bovine leukemia virus. *AIDS. Res. Human Retroviruses*, 17: 812.
- Aida, Y. 2004. Methods for judging resistance to the onset of bovine leukemia. United States patent 6815158. [cited 20 April 2006]. Available from URL: [http:// www.freepatentsonline.com/6815158.html](http://www.freepatentsonline.com/6815158.html).
- Amorena, B; Stone, W. 1978. Serologically defined (SD) locus in cattle. *Sci.* 201: 159-160.
- Andersson, L; Bohme, J; Peterson, P.A; Rask, L. 1986. Genomic hybridization of bovine class II major histocompatibility genes: 2. Polymorphism of DR genes and linkage disequilibrium in the DQ-DR region. *Anim. Genet.*, 17: 295-304.
- Baltian, L.R; Ripoli, M.V; Sanfilippo, S; Takeshima, S.N; Aida, Y; Giovambattista, G. 2012. Association Between BOLA-DRB3 and Somatic Cell Count in Holstein Cattle from Argentina. *Mol. Biol. Rep.*, 39: 7215-7220.
- Baxter, R; Craigmile, S.C; Haley, C; Douglas, A.J; Williams, J.L; Glass, E.J. 2009. BoLA-DR peptide binding pockets are fundamental for foot-and-mouth disease virus vaccine design in cattle. *Vaccine*, 28: 28-37.
- Castro, G.S; Trujillo, E.B; Duran, C.V. 2006. Polimorfismos del gen BoLA-DRB3 en el bovino sintético colombiano Lucerna y asociación con conteo de células somáticas y mastitis. *Rev. Col. Cienc. Pec.*, 19: 270-279.
- Chu, M.X; Ye, S.C; Qiao, L; Wang, J.X; Feng, T; Huang, D.W. *et al.* 2012. Polymorphism of exon 2 of BoLA-DRB3 gene and its relationship with somatic cell score in Beijing Holstein cows. *Mol. Biol. Rep.*, 39: 2909-2914.
- Davies, C; Andersson, L; Ellis, S.A; Hensen, E.J; Lewin, H.A; Mikko, S; Muggli-Cockett, N.E; Van der Poel, J.J; Russell, G.C. 1997. Nomenclature for factors of the BoLA system, 1996: report of the ISAG BoLA Nomenclature Committee. *Anim. Genet.*, 28: 159-168.
- Díaz, S; Ripoli, M.V; Peral García, P; Giovambattista, G. 2010. Marcadores genéticos para resistencia y susceptibilidad a enfermedades infecciosas en animales domésticos. En Giovambattista G, Peral Garcia P. *Genética de Animales Domésticos*. 1° Edición. Ed. InterMédica. Buenos Aires, Argentina. p. 157-178.
- Dietz, A.B; Dettileux, J.C; Freeman, A.E; Kelley, D.H; Stabel, J.R; Kehrl, M.E. 1997. Genetic association of bovine lymphocyte antigen DRB3 alleles with immunological traits of Holstein cattle. *J. Dairy Sci.*, 80: 400-405.
- Do Nascimento, C.S; Machado, M.A; Martinez, M.L; Barbosa Da Silva, M.V.G; Martins. M.F.G; Campos, A.L; Sousa, A.L.A; Teodoro, R.L; Da Silva, R.V; Fancioni, S.E.G; Andarade, D.A.O. 2006. Association of the bovine major histocompatibility complex (BoLA) BoLA-DRB3 gene with fat and protein production and somatic cell score in Brazilian Gyr dairy cattle (Bos indicus). *Genet. Mol. Biol.*, 29: 641-647.
- Fries, R; Eggen, A; Womack, J.E. 1993. The bovine genome map. *Mamm. Genome*, 4: 405-428.
- Greer, J.M; Pender, M.P. 2005. The presence of glutamic acid at positions 71 or 74 in pocket 4 of the HLA-DR β 1 chain is associated with the clinical course of multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry*, 76: 656-662.
- Jacobson, E.M; Huber, A; Tomer, T. 2008. The HLA gene complex in thyroid autoimmu-

- nity: from epidemiology to etiology. *J. Autoimmun.*, 30: 58-62.
- Juliarena, M.A.; Poli, M.; Sala, L.; Ceriani, C.; Gutierrez, S.; Dolcini, G.; Rodriguez, E.M.; Mariño, B.; Rodríguez-Dubra, C.; Esteban, E.N. 2008. Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene. *Anim. Genet.*, 39: 432-438.
- Kelm, S.; Detilleux, A.; Freeman, A.; Kehrl, J.; Dietz, A.; Fox, L.; Butler, J.; Kasckovics, I.; Kelly, D. 1997. Genetic Association between parameters of innate immunity and measures of mastitis in periparturient Holstein cattle. *J. Dairy Sci.*, 80: 1767-1775.
- Konnai, S.; Takeshima, S.; Tajima, S.; Yin, S.A.; Okada, K.; Onuma, M.; Aida, Y. 2003. The influence of ovine MHC class II DRB1 alleles on immune response in bovine leukemia virus infection. *Microbiol. Immunol.*, 47: 223-232.
- Lim, Y.S.; Oh, H.B.; Choi, S.E.; Kwon, O.J.; Heo, Y.S.; Lee, H.C.; Suh, D.J. 2008. Susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis is associated with shared amino acid sequences at position 70-74 of the HLA-DRB1 molecule. *J. Hepat.*, 48: 133-139.
- Lunden, A.; Sigurdardottir, S.; Edfors-Lilja, I.; Danell, B.; Rendel, J.; Andersson, L. 1990. The relationship between bovine major histocompatibility complex class II polymorphism and disease studied by use of bull breeding values. *Anim. Genet.*, 21: 221-232.
- Machado, M.A.; Nascimiento, C.S.; Martinez, M. L.; Silva, M.V.G.B.; Campos, A.L.; Teodoro, R. L.; Verneque, R.S.; Guimaraes, S.E.F. 2005. Associação do loco BoLA-DRB3.2 com produção de leite em bovinos da raça Gir. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 57: 380-389.
- Mallard, B.A.; Leslie, K.E.; Dekkers, J.C.; Hedge, R.; Bauman, M.; Stear, M.J. 1995. Differences in bovine lymphocyte antigen associations between immune responsiveness and risk of disease following intramammary infection with *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.*, 78: 1937-1944.
- Matsushita, S.; Takahashi, K.; Motoki, M.; Komoriya, K.; Ikagawa, S.; Nishimura, Y. 1994. Allele Specificity of Structural Requirement for Peptides Bound to HLA-DRB1*0405 and -DRB1*0406 Complexes: Implication for the HLA associated Susceptibility to ethimazole-induced Insulin Autoimmune Syndrome. *J. Exp. Med.*, 180: 873-883.
- Miltiadou, D.; Law, A.S.; Russell, G.C. 2003. Establishment of a sequence-based typing system for BoLA-DRB3 exon 2. *Tissue Antigens*, 62: 55-65.
- Mirsky, M.I.; Olmstead, C.; Da, Y.; Lewin, H.A. 1998. Reduced bovine leukaemia virus proviral load in genetically resistant cattle. *Anim. Genet.*, 29: 245-252.
- Panci, C.J.; Suzuki, K.; Echeverria, M.G.; Sereña, M.S.; Metz, G.E.; Gonzales, E.T. 2009. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with resistance and susceptibility to persistent lymphocytosis in BLV infected Cattle Argentina. *J. Dairy Sci.*, 4: 123-128.
- Park, Y.H.; Joo, Y.S.; Park, J.Y.; Moon, J.S.; Kim, S.H.; Kwon, N.; Ahn, J.S.; Davis, W.C.; Davies, C.J. 2004. Characterization of lymphocyte subpopulations and major histocompatibility complex haplotypes of mastitis resistant and susceptible cows. *J. Vet. Sci.*, 5: 29-39.
- Rupp, R.; Hernandez, A.; Mallard, B.A. 2007. Association of bovine leukocyte antigen (BoLA) DRB3.2 with immune response, mastitis, and production and type traits in Canadian Holsteins. *J. Dairy Sci.*, 90: 1029-1038.
- Russell, G.C.; Marello, K.L.; Gallagher, A.; McKeever, D.J.; Spooner, R.L. 1994. Amplification and sequencing of expressed DRB second exons from *Bos indicus*. *Immunogenetics*, 39: 432-436.
- Scott, P.C.; Choi, C.L.; Brandon, M.R. 1987. Genetic organization of the bovine MHC class II region. *Immunogenetics*, 25: 116-122.
- Sharif, S.; Mallard, B.A.; Wilkie, B.N.; Sargeant, J.M.; Scott, H.M.; Dekkers, J.C.; Leslie, K.E. 1998. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease

- and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. *Anim. Genet.*, 29:185-193.
- Sharif, S; Mallard, B.A; Sargeant, J.M. 2000. Presence of glutamine at position 74 of pocket 4 in the BoLA-DR antigen binding groove is associated with occurrence of clinical mastitis caused by *Staphylococcus* species. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 76: 231-238.
- Sommer, S. 2005. The importance of immune gene variability (MHC) en evolutionary ecology and conservation. *Front. Zool.* 2: p.16.
- Spooner, R.L; Leveziel, H; Grosclaude, F; Oliver, R.A; Vaiman, M. (1978). Evidence for a possible major histocompatibility complex (BoLA) in cattle. *J. Immunogenet.*, 5: 325-346.
- Starkenbourg, R.J; Hansen, L.B; Kehrli, J.R.; Chester-Jones. 1997. Frequencies and effects of alternative DRB3.2 alleles of bovine lymphocyte antigen for Holsteins in milk selection and control line. *J. Dairy Sci.*, 80: 3411-3419.
- Sulimova, G.E; Uchina, I.G; Shaikhaev, G.O; Zakharov, I.A. 1995. DNA polymorphism of the BoLA-DRB3 gene in cattle in connection with resistance and susceptibility to leukemia. *Genetika*, 31: 1294-1299.
- Takeshima, S.N; Aida, Y. 2006. Structure function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Anim. Sci.*, 77: 138-150.
- Takeshima, S.N; Matsumoto, Y; Aida, Y. 2009. Establishment of a new polymerase chain reaction-sequence- based typing method for genotyping cattle's major histocompatibility complex class II DRB3 (Short communication). *J. Dairy Sci.*, 92: 2965-2970.
- Torres-Galván, M.J; Quiralte, J; Blanco, C; Caststillo, R; Carrillo, T; Pérez-Aciego, P; Sánchez-García, F. 2000. Pocket 4 in the HLA-DRB1 antigen-binding groove: an association with atopy. *Allergy*, 55: 398-401.
- Vooter, C.E.M; Amicosante, M; Berretta, F; Groeneveld, I; Drent, M; van den Berg-Loonen, E.M. 2007. HLA class II amino acid epitopes as susceptibility markers of sarcoidosis. *Tissue Antigens*, 70: 18-27.
- Xu, A; van Eijk, M.J; Park C; Lewin, H.A. 1993. Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. *J. Immunol.*, 151: 6977-6985.
- Yoshida, T; Mukoyama, H; Furuta, H; Kondo, Y; Takeshima, S.N; Aida, Y; Kosugiyama, M; Tomogane, H. 2009. Association of the amino acid motifs of BoLA-DRB3 alleles with mastitis pathogens in Japanese Holstein cows. *Anim. Sci.*, 80: 510-519.
- Yoshida, T; Furuta, H; Kondo, Y; Mukoyama, H. 2012. Association of BoLA-DRB3 alleles with mastitis resistance and susceptibility in Japanese Holstein cows. *Anim. Sci. J.*, 83: 359-366.
- Zambrano, J.C; López-Herrera, A; Echeverri, J.J. 2011. Alelos del gen BoLA DRB3.2 están asociados con mastitis en vacas lechera. *Rev. Col. Cienc. Pec.*, 24: 145-156.
- Zanotti, M; Poli, G; Ponti, W; Poli, M; Rocchi, M; Bolzani, E; Longeri, M; Russo, S; Lewin, H.A; van Eijk, M.J. 1996. Association of BoLA class II haplotypes with subclinical progression of bovine leukaemia virus infection in Holstein-Friesian cattle. *Anim. Genet.*, 27: 337-341.
- Zerva, I; Cizma, B; Mehra, N; Alahari, S.K; Murali, R; Zmijewski, C; Kamoun, M; Monos, D.S. 1996. Argine at positions 13 or 70-71 in pocket 4 of HLA-DR1 alleles is associated with susceptibility to *Teberculoid* leprosy. *J. Exp. Med.*, 183:829-836.

Tabla 1. Frecuencias génicas de los motivos aminoacídicos, presentes en los sitios de unión al antígeno, en los alelos del gen BoLA-DRB3 detectados en la población en estudio

Alelos gen DRB3	Frec. génicas grupo control	Frec. génicas grupo caso	Posiciones de los motivos aminoacídicos en cada bolsillo para alelos del gen BoLA-DRB3																			
			Bolsillo 9			Bolsillo 6		Bolsillo 4						Bolsillo 7					Bolsillo 1			
			9	37	57	11	30	13	26	28	70	74	78	28	47	61	67	71	85	86	89	90
0101	10.53	9.52	E	Y	D	L	Y	S	F	E	R	N	Y	E	Y	W	L	K	V	V	F	T
0201	2.63	7.14	E	Y	D	H	Y	S	Y	D	R	N	Y	D	Y	W	I	K	V	V	F	T
0601		4.76	E	F	D	T	Y	K	F	N	R	A	Y	N	Y	W	I	A	V	G	F	T
0701	5.26	4.76	E	F	V	S	Y	S	L	D	R	Y	Y	D	Y	L	T	E	V	V	F	T
0901		2.38	E	F	D	T	Y	K	F	N	R	A	Y	N	Y	W	I	G	V	G	F	T
0902		11.90	E	V	D	T	Y	K	F	D	R	A	Y	D	Y	W	I	A	V	G	F	T
1001	5.26	4.76	E	F	D	S	Y	S	F	D	R	A	Y	D	Y	W	F	A	G	V	F	T
1101	21.05	16.67	E	I	D	S	S	K	F	D	E	A	Y	D	Y	W	F	K	V	G	F	T
1102	5.26		E	Y	S	Y	H	G	L	D	R	E	V	D	F	W	F	K	V	V	*	*
1201	2.63		E	F	A	S	Y	S	Y	D	D	S	Y	D	F	W	T	E	V	G	F	T
1401	2.63		* F	A	*	H	G	L	D	Q	E	V		D	F	W	F	K	G	V	*	*
14011	7.89		E	F	D	Y	C	R	F	D	E	E	V	D	F	W	F	R	V	G	F	T
1501	10.53	9.52	E	Y	D	A	Y	S	F	H	R	Y	Y	H	F	W	I	E	V	G	F	T
1502	2.63		E	F	S	S	Y	S	Y	D	R	Y	Y	D	Y	L	T	E	V	V	*	*
1601		2.38	E	L	S	A	Y	S	F	D	D	S	Y	D	F	L	F	E	V	V	F	T
1701		2.38	E	T	D	S	Y	S	F	D	R	Y	Y	D	F	W	T	E	G	V	F	T
1801	2.63	2.38	E	F	D	C	S	S	F	E	Q	N	Y	E	Y	W	L	K	V	V	F	T
20011		2.38	E	R	S	C	Y	R	L	D	Q	A	Y	D	F	W	F	R	V	V	F	T
2006	10.52	7.14	Q	Y	S	H	H	G	L	D	R	E	V	D	Y	W	I	R	V	G	F	T
2701	2.63	7.14	E	F	D	Y	C	R	F	D	E	E	V	D	F	W	F	R	V	G	F	T
2703	2.63		Q	F	A	H	H	G	L	D	Q	E	V	D	F	W	F	K	G	V	F	T
2707	2.63	2.38	E	F	A	Y	H	G	F	D	Q	E	V	D	F	W	F	K	G	G	F	T
4401	2.63		E	R	S	T	Y	K	L	D	Q	A	Y	D	Y	W	F	R	V	V	F	T
4501		2.38	E	Y	D	S	Y	G	Y	D	Q	E	V	D	F	W	F	K	G	V	F	T

Referencias: D, Acido aspártico: Asp; I, Isoleucina: Ile; E, Acido Glutámico: Glu; L, Leucina: Leu; A, Alanina: Ala. K, Lisina: Lys; R, Arginina: Arg; M, Metionina: Met; N, Asparagina: Asn; P, Prolina: Pro; C, Cisteína: Cys; S, Serina: Ser; F, Fenilalanina: Phe; Y, Tirosina: Tyr; G, Glicina: Gly; T, Treonina: Thr; Q, Glutamina: Gln; W, Triptófano: Trp; H, Histidina: His y V, Valina: Val.

Tabla 2. Asociación de motivos aminoacídicos presentes en el bolsillo 1 y CCS

Posición y motivos aminoacídicos en el bolsillo 1				Test Exacto de Fisher	OR	IC
G	G	F	T	-	-	-
G	V	F	T	-	-	-
V	G	F	T	0,82	0,84	0,31-2,23
V	V	F	T	0,81	1,15	0,39-3,35

Referencias: OR: Odd Ratio. IC: intervalo de confianza. Aminoácidos: F, fenilalanina; G, glicina; T, treonina; V, valina.

Tabla 3. Asociación de motivos aminoacídicos del bolsillo 4 y CCS

*Posición y motivos aminoacídicos en el bolsillo 4						Test Exacto de Fisher	OR	IC
G	F	D	Q	E	V	-	-	-
S	F	D	R	A	Y	0,78	0,82	0,23-2,85
G	L	D	Q	E	V	-	-	-
S	F	D	R	Y	Y	-	-	-
G	L	D	Q	E	V	-	-	-
G	Y	D	Q	E	V	-	-	-
K	F	N	R	A	Y	0,78	0,82	0,23-2,85
K	F	D	R	A	Y	-	-	-
K	F	D	E	A	Y	0,77	1,32	0,37-4,86
S	Y	D	D	S	Y	-	-	-
R	F	D	E	E	V	0,78	0,82	0,23-2,85
S	F	H	R	Y	Y	-	-	-
G	L	D	R	E	V	0,70	1,52	0,23-11
S	F	E	R	N	Y	0,79	0,77	0,24-2,36
S	Y	D	R	N	Y	-	-	-
S	L	D	R	Y	Y	-	-	-
S	Y	D	R	Y	Y	-	-	-
S	F	D	D	S	Y	-	-	-
S	F	E	Q	N	Y	0,78	0,82	0,23-2,85
R	L	D	Q	A	Y	-	-	-
K	L	D	Q	A	Y	-	-	-

Referencias: OR: Odds Ratio. IC: intervalo de confianza. Aminoácidos: A, alanina; D, ácido aspártico; E, ácido glutámico; F, fenilalanina; G, glicina; H, histidina; K, lisina; L, leucina; N, asparagina; R, arginina; S, serina; V, valina; Y, tirosina.

Tabla 4. Asociación de motivos aminoacídicos del bolsillo 6 y CCS

Posición y motivos aminoacídicos en el bolsillo 6		Test Exacto de Fisher	OR	IC
Y	H	-	-	-
*	H	-	-	-
S	Y	1	1,12	0,27-4,6
H	H	-	-	-
S	S	1	1,11	0,19-6,4
Y	C	-	-	-
A	Y	1	0,87	0,15-4,42-
H	H	0,46	1,95	0,34-13,5
L	Y	1	1,11	0,19-6,4
H	Y	-	-	-
C	S	-	-	-
C	Y	-	-	-
T	Y	0,03	0,11	0,0025-0,95

Referencias: OR: Odds Ratio. IC: intervalo de confianza. Aminoácidos: A, alanina; C, cisteína; H, histidina; S, serina; T, treonina; Y, tirosina, * desconocido.

Tabla 5. Asociación de motivos aminoacídicos del bolsillo 7 y CCS

Posición y motivos aminoacídicos en el bolsillo 7					Test Exacto de Fisher	OR	IC
D	F	W	F	K	0,34	3,46	0,264-188
D	Y	W	F	A	1	1,10	0,076-16,03
D	F	W	T	E	-	-	-
D	F	W	F	K	-	-	-
N	Y	W	I	A	-	-	-
N	Y	W	I	G	-	-	-
D	Y	W	I	A	-	-	-
D	Y	W	F	K	1	1,11	0,19-6,48
D	F	W	T	E	-	-	-
D	F	W	F	R	1	1,11	0,19-6,48
H	F	W	I	E	-	-	-
D	Y	W	I	R	-	-	-
D	F	W	F	R	1	1,11	0,19-6,48
E	Y	W	L	K	-	-	-
D	Y	W	I	K	0,77	1,32	0,37-4,86
D	Y	L	T	E	0,66	1,7	0,18-21,4
D	F	L	F	E	-	-	-
D	Y	W	F	R	-	-	-

Referencias: OR: Odds Ratio. IC: intervalo de confianza. Aminoácidos: A, alanina; D, ácido aspártico; E, ácido glutámico; F, fenilalanina; I, isoleucina; K, lisina; L, leucina; R, arginina; T, treonina; W triptófano; Y, tirosina.

Tabla 6. Asociación de motivos aminoacídicos del bolsillo 9 y CCS

Posición y motivos aminoacídicos en el bolsillo 9			Test Exacto de Fisher	OR	IC
E	F	A	-	-	-
E	F	D	0,78	0,82	0,23-2,85
*	F	A	-	-	-
E	T	D	-	-	-
Q	F	A	-	-	-
E	V	D	-	-	-
E	I	D	0,77	1,32	0,37-4,86
Q	Y	S	0,70	1,52	0,23-11
E	Y	D	0,79	0,77	0,24-2,36
E	F	V	-	-	-
E	Y	S	-	-	-
E	R	S	-	-	-

Referencias: OR: Odds Ratio. IC: intervalo de confianza. Aminoácidos: A, alanina; D, ácido aspártico; E, ácido glutámico; F, fenilalanina; I, isoleucina; Q, glutamina; R, arginina; S, serina; V, valina; Y tirosina; *, desconocido.